대한예방한의학회지 제11권 제1호(2007년 6월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2007 ; 11(1) : 9-21

랫드의 두개골세포 활성 및 mRNA 발현에 미치는 홍화자의 영향

김태웅 · 황귀서*
경원대학교 한의과대학

Effects of Carthami Tinctorius on Rat Calvarial Cell Activity and MG63 Cell mRNA Synthesis

Tae Woong Kim & Gwi Seo Hwang*
College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of Carthami tinctorius(HH) on osteoblast function and gene expression. The osteoblasts separated from the rat calvariae were cultivated to evaluate the cell function, and MG-63 cell was also cultivated for the test of mRNA synthesis. In this experiments, cell proliferation of rat calvarial cells was increased by HH. PKC activity, intracellular free calcium level and collgen synthesis from calvarial cells were increased by HH, but not PKA activity. And the mRNA of PLA_2, COX-2, and PGE_2 synthase from MG-63 were decreased by HH, but the mRNA of prostacyclin synthase was increased. It is concluded that HH might increase the proliferation of calvarial celll resulted from augumentation of osteoblast activity and its mRNA synthesis.

Key words : Carthami tinctorius, rat calvarial cells, MG63 Cell

* Corresponding author : Gwi Seo Hwang, College of Oriental Medicine, Kyungwon University, San 65, Bokjeong-dong, Sujeong-gu, Seongnam-shi, Kyunggi-do 461-701, E-mail : seoul@kyungwon.ac.kr

I. 서 론

평균수명이 연장됨에 따라 퇴행성 질환은 삶의 질을 위협하는 중요한 보건학적 지표가 되고 있다. 특히, 노인층의 주요한 사망원인 중의 하나인 골격질환의 대부분은 골 밀도의 감소로 특징지어지는 골다공증과 관련된 것으로 보고되었다(1-2).

골다공증의 유발인자로는 노화, 여성의 폐경, 갑상선 기능 항진증, 당뇨병, 스트레스, 흡연 및 운동 부족등이 알려져 있다. 이 중 노인성 골다공증에서는 노화에 수반된 성호르몬의 감소와 부갑상선 호르몬의 분비 증가가 나타나며, 폐경기 여성의 경우 에스트로겐 분비 저하가 골다공증 발병의 직접적 원인으로 작용한다(3-4). 에스트로겐은 파골세포의 PTH 수용체에 작용하여 파골세포의 기능을 억제한다. 부갑상선 호르몬인 PTH는 파골세포의 기능을 활성화시키고 골의 대사를 촉진하여 골다공증을 유발한다(5). 또한, 조골세포의 PTH 수용체의 합성 증가를 통해 PTH 호르몬에 대한 감수성을 증가시켜(6), 조골세포에 의해 생성되어 골의 기질물질로 작용하는 type I collagen 합성 유전자를 억제하고, collagenase 유전자를 발현시킴으로써 골 기질물질을 파괴한다(7). 최근에 prostaglandin 류가 조골세포와 파골세포의 기능을 조절하여 골밀도에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(8, 9) 이들은 Vitamin D_3, PTH, Calcitonin등의 작용으로 PLA_2가 활성화되어 생성되는 PGG_2, PGH_2, PGE_1, PGE_2 및 PGI_2 등이다. 이중 PGE_2는 파골세포(OC)의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성과 MAPK의 활성 증가를 통하여 RANKL(receptor activator NF-κB ligand)의 발현을 촉진한다(10, 11). 또한, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시키며, OC에서 cAMP에 의존적인 RANKL과 OPG-osteoprotogerin 의 작용을 거쳐 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수를 촉진한다(12). 이와는 반대로 PGI2는 cAMP에 의존적인 PKA의 작용을 통하여 조골세포(OB)의 MAPK, CREB를 활성화하여 c-fos promoter를 작동시킨다. OB내의 cAMP의 증가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성증가를 유도하며 OB의 분화와 증식을 촉진한다(13, 14).

홍화자는 홍화의 씨로서 민간에서 골다공증 개선에 효과적이라고 알려져 있다. 한의학에서는 홍화가 활혈거어 효능이 있어서 통경제나 분만시 진통촉진 등에 사용되었으며, 이와 관련해서는 혈소판 응집능 억제 및 심장질환 개선 작용등의 효능이 보고되었다(15). 최근 연구 결과, 홍화자는 치주인대 섬유아 세포의 분열을 촉진하고 치주 경조직을 증식시키는 것으로 보고되었다(16). 또한, 랫드의 두개골 결손부에서 골조직의 재생을 유도하고(17), 조골모유사세포의 기능과 신생골의 형성을 증가시키며(18, 19), 난소 제거 랫드의 골밀도를 증가시키는 것으로 보고되었다(20).

본 연구에서는, 홍화자 추출물의 효과를 확인하기 위하여 랫드의 두개골에서 분리하여 배양한 골세포의 증식능 및 Collagen 생합성, ALP 생성능에 대해서 검토하고, 작용 기전을 밝히는 연구로 PKC 및 PKA에 미치는 영향과 세포내 Ca 농도에 미치는 영향을 평가하였다. 이와 동시에 골세포의 기능에 관여하는 단백질의 mRNA 합성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MG-63를 이용하여 검색을 실시하였다.

Ⅱ. 실험 방법

1. 재료

1) 실험 동물

실험동물은 임신된 암컷 S.D. 랫드를 대한 바이오링크에서 구입하여 실험실에 3일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 고형사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 분만 바로 전에 태자를 꺼내어 두개골세포를 분리하였다. 유전자 검색용 세포는 Osteoblastic Cell line 인 MG-63을 ATCC(USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 한약재 추출 및 검액 제조

紅花子(Carthami tinctorius) 100g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, MeOH 500ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator(EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 홍화자 추출물(이하 HH라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45um의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다. DMSO 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다.

2. 방법

1) 약물처리

실험군은 (1) 정상군(NC), (2) 1㎍/㎖의 홍화자 추출물을 투여한 군(HH1), (3) 10㎍/㎖의 홍화자 추출물을 투여한 군(HH10)으로 하였다.

2) 두개골 세포 활성에 미치는 영향 측정

(1) 두개골 세포 분리 및 배양

세포배양은 임신 21일 된 쥐의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 후, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. calvarie에 붙어있는 결체조직을 제거하고, HBSS로 세척했다. calvarie를 collagenase, trypsin, EDTA 용액에 넣어 37℃에서 반응시켰다. 상층액을 취하여 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하고 원심분리하여 세척한 후, DMEM 배지에 넣어 재현탁하고 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 10일간 배양한 세포는 Trypsin처리하여 세포수를 측정한 후 실험에 사용하였다.

(2) 세포의 증식능 측정

10일간 일차 배양한 세포를 subculture한 후, 2일 후부터 검체를 투여한 다음 2일 간격으로 배지를 교환하고 계속하여 검체를 투여하였다. 다시 6일이 경과한 다음, 배양한 세포의 수를 세기 위하여 세포의 배지를 제거하고 HBSS로 세포를 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였다. 세포를 Isoton-2 solution을 이용하여 희석한 후 세포계수기(sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

(3) 골세포의 protein kinase C의 활성 측정

세포를 PBS로 washing 한 후 DMEM 배지에서 1시간동안 안정시켰다. Culture plate에 cell이 confluent 해지기 전의 상태에서 실험하였다. 10% FBS가 포함된 배지를 가하고, 약물을 가해 일정시간(1시간, 2시간) 배양한 후 PBS로 washing하였다. Scrapper를 사용하여 세포를 긁어내어 suspension buffer(20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 250mM

sucrose, 5mM DTT, 0.24mM leupeptin, 0.1% triton X-100)에 현탁시켰다. sonication하여 세포를 파쇄한 후 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. Reactoin buffer (100mM HEPES, pH 7.4, 6.5mM $CaCl_2$, 5mM DTT, 50mM $MgCl_2$, 5mM ATP)에 PKC substrate(PLSRTLSVAAK, 0.4mg/ml)를 가하고, phosphatidyl serine(5μM) solution을 가하였다. Peptide protection solution(PMSF 1mM, E-64 5 μM, leupeptin 50μM in water)을 1μl 가한 후, sample을 가하여 30분간 30℃에서 반응시켰다. 반응을 종료하기 위하여 반응액을 95℃에서 10분간 가온하였다. 반응액의 점성을 높이기 위해 80% glycerol(in water)를 가하여 주고, 0.8% agarose gel(in 50mM tris-HCl buffer, pH 8.0)에 loading하여 100V의 전압에서 전기영동하였다. Gel을 취하여 UV 광선하에서 fluorescence를 촬영하여 band의 양상을 관찰하였다. Phosphorylation된 substrate의 양을 측정하기 위하여 band가 나타난 gel을 일정량씩 취하여 용해시킨 후 570nm에서 흡광을 측정하였다.

(4) 골세포의 protein kinase A의 활성 측정

세포를 PBS로 washing 한 후 DMEM 배지에서 1시간동안 안정시켰다. Culture plate에 cell이 confluent 해지기 전의 상태에서 실험하였다. 10% FBS가 포함된 배지를 가하고, 약물을 가해 일정시간(1시간, 2시간) 배양한 후 PBS로 washing하여, scrapper를 사용하여 세포를 긁어내어 suspension buffer(20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 250mM sucrose, 5mM DTT, 0.24mM leupeptin, 0.1% triton X-100)에 현탁시켰다. sonication 하여 세포를 파쇄한 후 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. Reactoin buffer(100mM Tris-HCl, pH 7.4, 50mM $MgCl_2$, 5mM ATP)에 PKA substrate(LRRASLG, 0.4mg/ml)를 가하고, cAMP(5μM) solution을 가하였다. Peptide protection solution(PMSF 1mM, E-64, leupeptin 50μM in water)을 가한 후, sample을 가하여 30분간 30℃에서 반응시켰다. 반응을 종료하기 위하여 반응액을 95℃에서 10분간 가온하였다. 반응액의 점성을 높이기 위해 80% glycerol(in water)를 가하여 주고, 0.8% agarose gel(in 50mM tris-HCl buffer, pH 8.0)에 loading하여 100V의 전압에서 전기영동하였다. Gel을 취하여 UV 광선하에서 fluorescence를 촬영하여 band의 양상을 관찰하였다. Phosphorylation된 substrate의 양을 측정하기 위하여 band가 나타난 gel을 취하여 용해시킨 후 570nm에서 흡광을 측정하였다.

(5) 세포내 Ca^{2+}농도의 변화 측정

Non-confluent 한 상태의 세포를 trypsin과 EDTA(in Phosphate-buffered saline)로 3분간 처리하여 culture dish 로부터 취하였다. 원심분리하여 세포의 pellet을 얻고 loading buffer (145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 10mM glucose, 10mM HEPES, 1% bovine serum albumin, 2.5mM probenecid, pH 7.4)에 재현탁시켰다. Fura-2-acetoxymethyl ester를 가하고 45분간 37℃에서 반응시켜 loading 시켰다. Fure-2-AM이 loading 된 세포를 washing하여 3×10^6/2ml로 만든 후 Fluorescence spectrometer를 사용하여 형광을 측정하였다(Dual Excitation/Emission, 340, 380/505nm).

Basal fluorescence는 Fluorescence spectrometer에서 세포현탁액을 2분간 안정화 시킨 후, 2mM의 EGTA를 가하여 얻었으며, 이후 0.01% Triton X-100을 가하여 Minimal fluorescence를 얻었다. 이후 10mM의 Ca^{2+}을 넣어 Maximal fluorescence를 얻었다. 이후 세포내 Ca^{2+}농도의 양은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$[Ca^{2+}] = Kd(F-Fmin)/(Fmax-F)$

Kd : dissociation constant for Fura-2(224nM, 37℃)
F : Fluorescence detected
Fmin : Minimal fluorescence
Fmax : Maximal fluorescence

(6) 두개골 세포 Collagen 합성량 측정

N Kohei 등의 방법을 사용하였다. cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell을 긁어내었다. 이를 dithiothreitol이 함유된 Tris buffer에 현탁시킨 후 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후, 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 pellet에 HCl을 가하여 24시간동안 가수분해하였다. 이를 조심스럽게 NaOH로 중화시킨 후, 물을 이용하여 적정한 농도로 희석하였다. Hydroxy-proline은 amino acid analyzer를 이용하여 정량하였다.

3) 조골세포의 mRNA 생성에 미치는 영향

(1) MG-63 Cell의 배양

인간의 골에서 얻은 Cell-line인 MG-63을 급속히 해동시킨 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(SM-PC, fungizone 포함)에 배양하였다. 7일간 배양 후 세포를 수거한 다음, 세포 수 6×106cell/㎖이 되도록 현탁시켜 4시간 배양하였다. CF 추출물을 배지에 녹인 후 0.45um pore size를 가진 membrane filter에 통과시킨 시험용 sample을 배양된 세포에 50㎍/㎖의 농도가 되도록 첨가하여 15시간 배양하였다. 여기에 대조군에는 샘플 cy3를 시험군에는 cy5를 50㎍/㎖이 되도록 처리한 다음 10시간을 추가 배양하였다.

(2) tRNA(total RNA) 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4℃ PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750×g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 加하여 용해시킨 다음, 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37℃에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/$CsKl_3$ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 加한 후 -20℃에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

(3) cDNA 제조 및 정제

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13㎎ RNA 함유)에 oligo dT 1㎕을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70℃에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42℃에서 90분간 incubation 한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 가한 후 37C에서 15분간 incubation 하였으며, 2M HEPES buffer를 加하여 중화시켰다. 제조된 cDNA 액을 GFX column상에 loading한 다음, capture buffer와 washing soln을 사용하여 elution시켰다. Cy3-, Cy5-labelled cDNA 양을 각각 60㎕ 만큼 elution하였다.

(4) 유전자 발현의 확인 및 정량

각각의 cy3-, cy5- labelled cDNA를 speed vacum container에 3시간 동안 건조한 다음,

nuclease free water에 녹였다. 95℃에서 가열한 다음, 곧바로 얼음상에 30초 이상 방치하였다. 여기에 hybridization buffer와 100% formamide를 가한 후 조심스럽게 섞었다. 혼합된 액을 microarray slide와 cover slip 사이에 loading하였다. cDNA가 loading된 microarray slide를 hybridization chamber에 넣고 42℃에서 18시간 동안 incubation하였다. microarray slide를 SDS가 함유된 55℃로 가온된 SSC(saline, SDS, citrate)buffer에 넣어 55℃에서 10분간 2회 washing하였다. 다시 희석한 SSC buffer로 상온에서 10분간 washing한 다음, 1,000rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 데시케이터에 1시간 방치하여 건조한 다음, scanner에 넣고 발현된 mRNA양을 측정하였다.

3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 실험결과

1. 두개골세포 증식능에 미치는 영향

랫드의 두개골 세포로부터 분리한 골세포를 10일간 1차 배양한 다음, 계대 배양을 2일간 시행한 다음, 세포에 검체를 투여하여 6일간 배양하여 세포 증식능에 미치는 영향을 측정 하였다. 측정 결과, Calvarial Cell 숫자는 1㎍/㎖의 농도를 가진 HH1 group에서 NC(Normal Control)에 비해 약 27% 증가하였고, 10㎍/㎖인 HH10 group에서는 NC에 비해 약 39% 증가하였다.

2. 두개골 세포의 Protein Kinase C (PKC) 활성에 미치는 영향

Calvarial Cell의 분열 및 증식은 osteoblastogenic factor가 수용체에 결합된 후 세포내 신호전달 체계를 거쳐 단백질을 발현시킨다. HH가 골세포의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 골세포 분열에 관여하는 주요 신호전달 과정인 Protein Kinase C의 활성을 측정하였다. 효소활성은 계대배양 후 7일째에 측정하였다. 실험 결과, Protein Kinase C 활성은 1㎍/㎖의 농도를 가진 HH1 group에서 NC(Normal Control)에 비해 약 36% 증가하였고, 10㎍/㎖ 인 HH10 group에서는 NC에 비해 약 43% 증가하였다.

3. 두개골 세포의 Protein Kinase A (PKA) 활성에 미치는 영향

Protein Kinase A는 주요한 신호전달 과정의 하나로 수용체에 결합한 osteoblastogenic factor가 Calvarial Cell이 증식하는 과정에 관여한다. HH가 골세포의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 계대배양 후 7일째에 Protein Kinase A의 활성을 측정하였다. 실험 결과, Protein Kinase C 활성은 1㎍/㎖의 농도를 가진 HH1 group 및 10㎍/㎖ 인 HH10 group 모두에서 NC(Normal Control)과 별다른 변화가 없었다.

4. 두개골 세포의 Intracellular Calcium 양에 미치는 영향

Intracellular free calcium은 세포내 신호 물질로서 작용하며, Ca^{2+} 의존적인 효소의 작용을 증가켜 세포의 활성에 관여한다. Intracellular Ca^{2+} 이온 농도변화에 대한 영향을 보기위해

약물 투여 후 2일, 7일째, 14일째 된 배양세포에 대해 Fura-2/AM을 loading하고 형광변화를 관찰하였다. 그 결과, HH1(1㎍/㎖) 군의 경우 2일째에는 NC 군에 비해 별다른 변화를 나타내지 않았으나, 7일째에는 NC 군에 비해 약 38% 증가를 보여 세포의 활성이 증가함을 알 수 있었으며 14일째에는 NC 군과 거의 비슷한 수치를 보여 세포증식이나 기능세포로서의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

5. 두개골 세포의 Collagen Synthesis에 미치는 영향

조골세포는 골 기질 단백질인 Collagen을 생산하여 골의 형성을 유도한다. Collagen 합성능에 대한 평가는 시료 투여 후, 7일째, 14일째 측정하였다. 실험 결과, 두개골 세포에서의 collagen 합성은 HH 1㎍/㎖의 농도를 가진 HH1군의 경우 NC군에 비해 7일째에는 약 48%, 14일째에는 약 37%의 증가를 나타냈다. 또한, HH 10㎍/㎖ 의 농도인 HH10 군의 경우 NC군에 비해 7일째에는 약 64%, 14일째에는 약 67% collagen 합성을 증가시켰다. 따라서 골 형성을 증가시켜 골다공증을 예방할 수 있을 것으로 판단되며, 골 기질물질의 특이 단백질인 collagen의 생합성을 增加시킬 것으로 판단된다.

6. MG-63 세포의 mRNA 생성에 미치는 영향

골세포에서 PLA_2 mRNA 발현은 mRNA에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 mRNA 양(C)은 약 2.43이었으며, 홍화자 추출물을 첨가하여 배양한 군(HH)의 mRNA의 양은 약 1.61로 mRNA 발현이 억제되었다. COX mRNA 발현 실험에서 대조군(C)의 mRNA 양은 약 0.99이었으며, 홍화자 추출물을 첨가하여 배양한 군(HH)의 mRNA의 양은 약 0.70으로 mRNA 발현이 억제되었다. 또한, PGE2 mRNA 발현 실험에서 대조군의 mRNA 양(C)은 약 0.23이었으며, 홍화자 추출물을 첨가하여 배양한 군(HH)의 mRNA의 양은 약 0.15으로 mRNA 발현이 억제되었다. 그러나, Prostacyclin synthasemRNA 발현 실험 결과, 대조군(C)의 mRNA 양은 약 3.41이었으며, 홍화자 추출물을 첨가하여 배양한 군(HH)의 mRNA의 양은 약 3.95로 mRNA 생성이 증가되었다.

Ⅳ. 고 찰

골다공증은 骨의 구성성분의 양적 감소를 주된 병변으로 하는 대사성 골 질환으로, 골의 형성에 관여하는 조골세포 기능과 골 흡수 작용을 하는 파골세포 기능의 균형이 파괴되어 나타나며, 주로 노화, 당뇨, 스트레스, 약물남용, 난소기능 감소 등이 원인이 되어 유발된다(3, 4). 일반적으로 뼈에서는 칼슘의 흡수와 침착과정이 균형을 이루고 있으나, 골다공증에서는 골대사의 불균형으로 인해 골 기질물질을 형성하는 조골세포의 활성이 감소하거나, 또는 골 흡수를 유발하는 파골세포의 활성증가가 나타나고 있다.

골 기질물질을 형성하는 조골세포의 분화와 증식은 여러 가지 호르몬과 같은 전신적인 인자, cytokine과 성장인자와 같은 국소적인 인자에 의하여 조절된다(5, 6). 스테로이드 호르몬, 성 호르몬, 성장 호르몬등은 특수 수용체를 경유하여 직접적으로 조골세포의 분화와 증식에 영향을 미친다. IL-1α, IL-1β, TNFα, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, INFγ와 같은 cytokines은 면역반응과 염증반응을 동반하는 다기능성으로 조골세포의 분화와 증식에 영향을 미치며, platelet-derived growth factor(PDGF), trans-

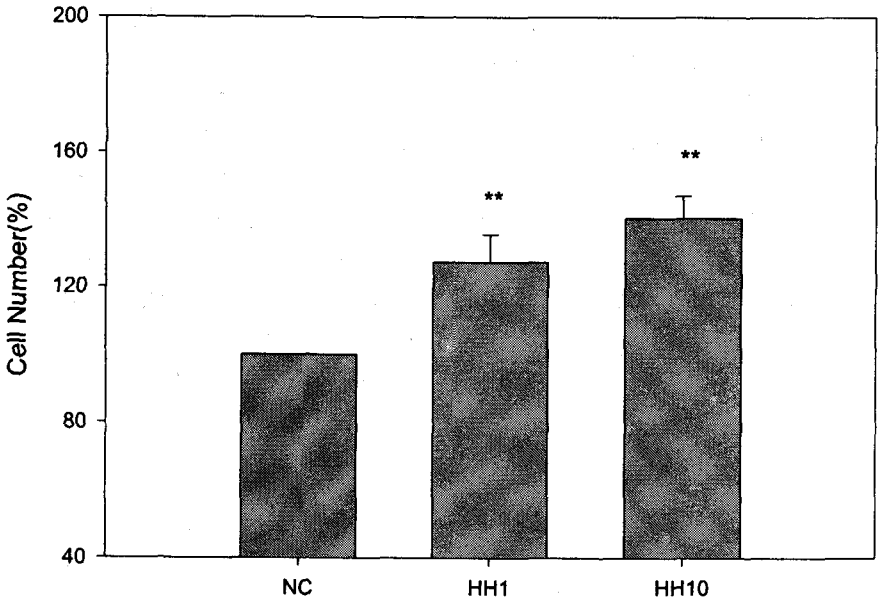

Fig. 1 Effect of HH on Cell proliferation of Rat Calvarial Cell. Cell Number was determined at 6th days.

NC : vehicle
HH1 : 1ug/ml of HH extract
HH10 : 10ug/ml of HH extract
** : $p<0.01$ vs NC

forming growth factor(TGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF) 등의 성장인자들도 조골세포에 영향을 미칠 수 있다(21). 또한, 세포내 신호의 전달과정은 다른 세포와 마찬가지로 Protein kinase C(PKC)와 Protein kinase A, intracellular calcium 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(22).

본 연구에서는 우선적으로 골다공증에 효과적인 약재를 찾아내기 위하여 골세포 증식에 대한 홍화자의 작용을 검색하였다. 또한, 홍화자의 조골세포 증식능을 증가시키는 영향을 구체적으로 밝히기 위하여 조골세포에 의한 collagen 생합성과 PKC 및 PKA활성에 미치는 영향, 조골 세포내 자유 calcium 양등에 대하여 평가하였다. 이와 함께 골세포의 단백질 합성에 미치는 구체적인 작용기전 밝히기 위하여, 유전자 발현에 대한 검색을 실시하였다.

실험 결과, 홍화자 추출물(HH)은 조골세포의 증식능을 증가시켰으며(Fig. 1), 조골세포에 의한 collagen 생합성(Fig. 5), PKC 활성(Fig. 2), 조골 세포내 자유 calcium 양(Fig. 4) 등을 증가시켜 골 형성을 증가시키는 것으로 판단되었다. 이 연구결과를 바탕으로 홍화자가 골세포의 mRNA 생성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MG-63를 배양하여 유전자 검색 실험을 하였다. 조골세포의 PLA2는 Vitamin D_3, PTH, Calcitonin등의 자극에 의해 활성이 증가하여 세포막의 인지질로부터 AA를 유리하며, AA는 대사과정을 거쳐 생성되는 다양한 prostaglandin류를 통하여 조골세포와 파골세포의

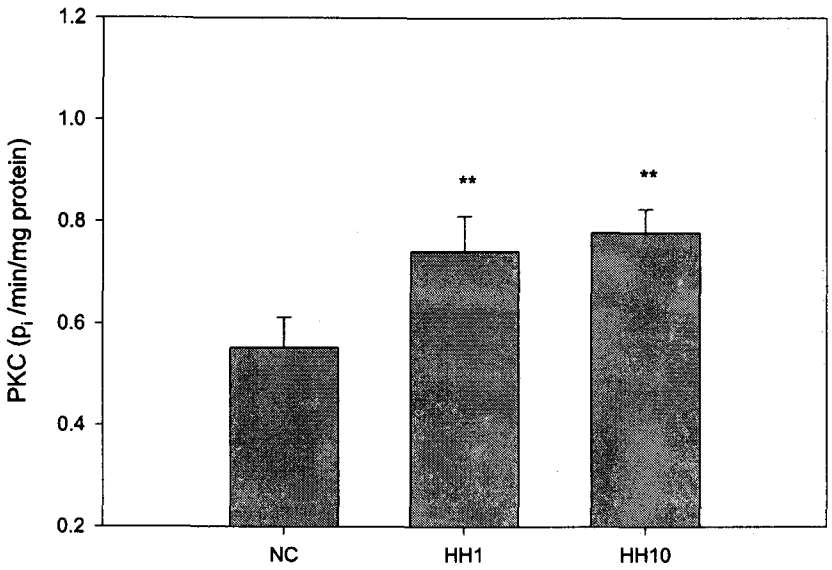

Fig. 2 Effect of HH on Protein Kinase C(PKC) Activity in Rat Calvarial Cell. PKC activity was determined at 7th days after starting subculture and was represented as contents of inorganic phosphate resulted from enzyme reaction.

NC : vehicle
HH1 : 1ug/ml of HH extract
HH10 : 10ug/ml of HH extract
** : $p<0.01$ vs NC

기능을 조절함으로써 골대사에 관여한다. PLA_2는 protease와 endonuclease의 활성을 증가시켜 골기질 물질의 분해와, DNA 파괴를 통하여 골의 재흡수를 유발한다. 또한, 골흡수를 촉진하는 Prostaglandin 류를 생합성하여 골다공증을 심화시키는 것으로 보고되었다(8, 9). 연구결과, 홍화자는 칼슘 의존적인 PLA_2의 mRNA 생성을 억제하여, 골기질 물질의 파괴를 통한 골손실에 억제효과가 있을 것으로 판단되었다. PLA_2 작용으로 유리된 AA는 COX-1과 COX-2를 통하여 prostaglandin endoperoxide를 생성한다. AA로부터 생성된 Pendoperoxide류는 지질의 peroxidation을 유발하고 caspase pathway를 통해 각종 세포의 apoptosis를 유발한다(9). 본 실험에서 홍화자가 조골세포의 COX mRNA 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 억제작용을 나타내었다. PGE_2의 생성 및 조골세포(OB) 및 파골세포(OC)의 분화 및 기능 활성화에 미치는 영향을 나타내고 있다. PGE_2는 OC의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성과 MAPK의 활성 증가시키고, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시키며, OC에서 cAMP에 의존적인 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다(14, 22). 실험결과, 홍화자는 PGE_2 synthase mRNA 생성을 억제하여 OC의 기능을 억제할 것으로 판단되었다. 이와는 별도로 prostacyclin은 cAMP에 의존적인 PKA의 작용을 통하여 OB의 MAPK를 활성화시키며, OB내의 cAMP의 증

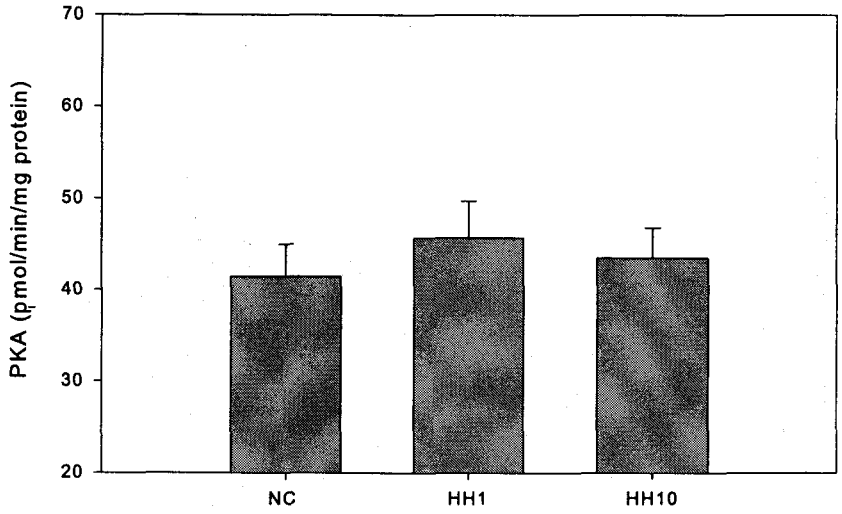

Fig. 3 Effect of HH on Protein Kinase A (PKA) Activity in Rat Calvarial Cell. PKA activity was determined at 7th days after starting subculture and was represented as contents of inorganic phosphate resulted from enzyme reaction.

NC : vehicle
HH1 : 1ug/ml of HH extract
HH10 : 10ug/ml of HH extract

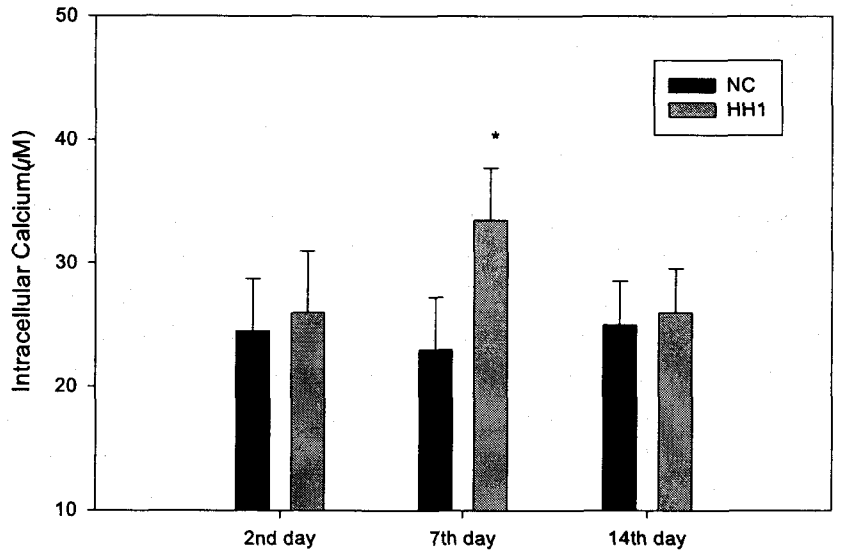

Fig. 4 Effect of HH on Intracellular Free Calcium in Rat Calvarial Cell. Intracellular free calcium level was determined at 2nd, 7th, and 14th days after starting subculture using Fura-2/AM.

NC : vehicle
HH1 : 1ug/ml of HH extract
* : $p<0.05$ vs NC

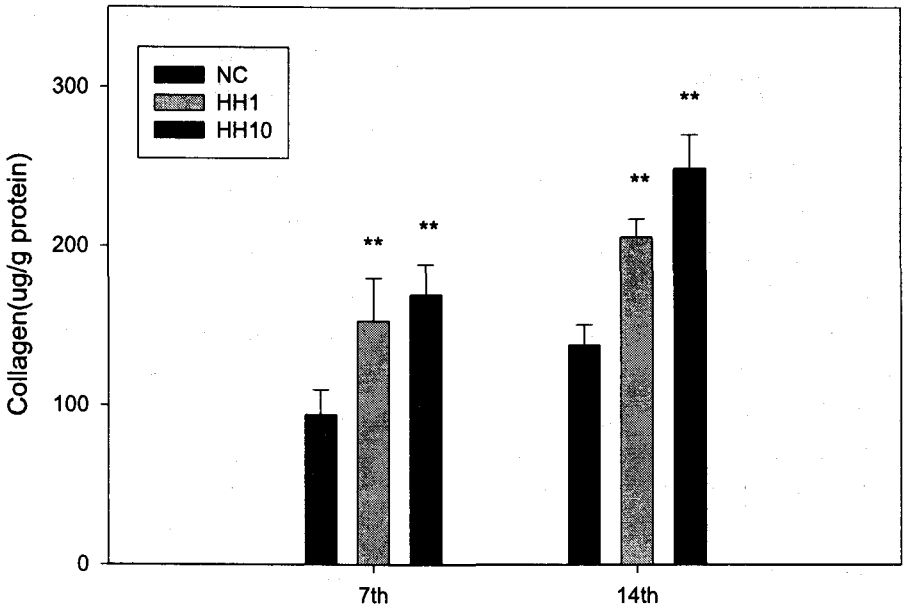

Fig. 5 Effect of HH on Collagen Synthesis in Rat Calvarial Cell. Collgen synthesis was determined at 7th days after starting subculture and was represented as contents of hydroxy-proline hydrolyzed from collagen.

NC : vehicle
HH1 : 1ug/ml of HH extract
HH10 : 10ug/ml of HH extract
** : $p<0.01$ vs NC

가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성증가를 유도하며 OB의 분화와 증식에 관여하고 있다. 또한, prostacyclin은 OB의 기능활성화 결과, 골기질의 형성을 유도하는 BMP(bone morphogenetic protein) 발현이 증가와 collagen 합성을 증가시킨다(23). 실험결과, 홍화자는 PKA와 PKC의 활성을 증가시켰으며(Fig. 2, Fig. 3), 또한 1차 배양된 랫드의 두개골 세포로부터 collagen 생합성과 단백질 합성을 증가시켰다(Fig. 5). 실험의 지표로 사용된 prostacyclin은 OB의 분화와 기능 활성화를 자극하고 OC의 분화와 OC로부터 MMP 유전자 발현을 억제하여 골의 재흡수를 차단할 수 있다고 보고되었다. 실험결과, 홍화자는 prostacyclin synthase의 mRNA 생성을 증가시켜 PGI_2의 생성을 증가시킬 것으로 판단되었다. 따라서, 홍화자는 cAMP을 증가시키며 PKA의 활성을 통해 조골세포의 기능을 활성화 시키며 파골세포의 기능을 억제하며, 골의 재흡수로 인한 골다공증의 치료 및 예방에 사용될 수 있을 것으로 판단되었다. 이상의 결과, 홍화자는 조골세포의 분열능 및 기능을 증가시킬 수 있는 것으로 평가되었으며, 이는 파골세포(OC)의 분화와 기능을 활성화시키는 단백질의 mRNA 발현을 억제하고, 조골세포(OB)의 분화와 기능을 활성화시키는 단백질의 mRNA 발현을 증가시켜 나타나는 것으로 사료되었다.

V. 結 論

홍화자 추출물(HH)이 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 증가시키는지 평가하기 위하여, 랫드의 두개골 세포 배양을 통하여 골 증식관련 인자를 측정하였다. 연구 결과, HH는 랫드의 두개골 세포의 증식능과 세포내 collagen 생합성을 증가시켰다. 이는 HH가 세포의 PKC 활성과 세포내 자유 calcium 양을 증가시킨 결과로 판단되었다. 그러나, PKA 활성에는 영향을 주지 못했다. 또한 HH는 MG-63의 PLA_2, COX, PGE_2 synthase의 mRNA 생성을 억제하고, Prostacyclin synthase의 mRNA 생성을 증가시켜 조골세포 기능을 활성화시키고 파골세포의 기능을 억제할 가능성을 나타내었다.

참고문헌

1. 김기수 : 대한내분비학회 10주년 심포지움 논문집, pp35-48, 1996
2. 전국 한의과대학 재활의학과 교수 편저 : 동의재활의학과학, 서원당, pp.26-37, p.48, pp.181-184, 1995
3. Vedi S., Croucher P.I., Garrahan N.J., Compston J.E. Effet of hormone replacement therapy on canxellous bone microstructure in postmenopausal woman. Bone 19, 69-72, 1996
4. Czerny B, Pawlik A, Teister M, Juzyszyn Z, Mysliwiec Z. Effect of tamoxifen and raloxifene on cholesterol transformation to bile acids in ovariectomized rats. Gynecol Endocrinol. 20(6) : 313-6, 2005
5. Khan AA, Syed Z. Bone densitometry in premenopausal women : synthesis and review. J Clin Densitom. 7(1) : 85-92, 2004
6. P. Urea et al. Regulation of PTH/PTH related peptide receptor Messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/28 and OK cell. Endocrinology, 134, 451-456, 1994
7. Delany AM et al. Cortisol increases interstitial Collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. J Biol Chem, 270 : 26607-26612, 1995
8. Miyaura C, Inada M, Matsumoto C, Ohshiba T, Uozumi N, Shimizu T, Ito A. An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. J Exp Med. 197(10) : 1303-10, 2003.
9. Gamradt SC, Feeley BT, Liu NQ, Roostaeian J, Lin YQ, Zhu LX, Sharma S, Dubinett SM, Lieberman JR. The effect of cyclooxygenase-2(COX-2) inhibition on human prostate cancer induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. Anticancer Res. 25(1A) : 107-15, 2005
10. Tomoyasu Ohshiba, Chisato Miyaura, and Akira Ito Role of rostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. Biochemical and Biophysical Research Communications 300 (4), 957-964, 2003
11. M. Tomita, X. Li, Y. Okada, F. N. Woodiell, R. N. Young, C. C. Pilbeam and L. G. Raisz. Effects of selective prostaglandin EP4 receptor antagonist on osteoclast formation and bone resorption in vitro. Bone 30(1), 159-163, 2002
12. M. Kanematsua, K. Yoshimuraa, M. Ta-

kaokia and A. Sato. ctor-averaged gravity regulates gene expression of receptor activator of NF-B(RANK) ligand and osteoprotegerin in bone marrow stromal cells via cyclic AMP/protein kinase A pathway. Bone 30(4), 553-558, 2002

13. Fortier, C. Patry, M. Lora, R. Samadfan and A. J. de Brum-Fernandes. Immunohistochemical localization of the prostacyclin receptor(IP) human bone. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 65(2), 79-83, 2001
14. Milena Romanelloa, Luigi Moroa, Doroti Pirullib, Sergio Crovellab and Paola. Effects of cAMP on Intercellular Coupling and Osteoblast Differentiation. Biochemical and Biophysical Research Communications. 282(5), 1138-1144, 2001
15. 본초학, 한국생약교수협의회 p553-555, 1995
16. 최성호 등, 홍화씨 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향, 대한치주과학회지 31, 833-846, 2001
17. 김성태 등, 백서 두개골 결손부에서 홍화씨 추출물의 골조직 재생 유도 효과, 대한치주과학회지 30, 835-852, 2001
18. 신형식 등, 홍화인 추출물이 골 형성에 미치는 영향에 대한 실험실적 연구, 대한치주과학회지 35, 461-474, 2005
19. 김용환 등, 홍화씨가 신생골 형성에 미치는 영향, 한국임상수의학회지 19, 66-72, 2002
20. 김상범 등, 홍화씨 요구르트 급여가 난소절제 랫드의 골다공증에 미치는 영향, 한국동물자원과학회지 46, 69-76, 2004
21. Cheung R, Erclik MS, Mitchell J. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated protein kinase C phosphorylation of type VI adenylyl cyclase inhibits parathyroid hormone signal transduction in rat osteoblastic UMR 106-01 cells. J Cell Biochem. 94(5) : 1017-27, 2005
22. Kwok S, Qin L, Partridge NC, Selvamurugan N. Parathyroid hormone stimulation and PKA signaling of latent transforming growth factor-beta binding protein-1(LTBP-1) mRNA expression in osteoblastic cells. J Cell Biochem. 95(5) : 1002-11, 2005
23. J. M. Nervinaa, 1, S. Tetradisa, 1, Y. -F. Huanga, D. Harrisona, C. Molinab and B. E. KreamExpression of inducible cAMP early repressor is coupled to the cAMP-protein kinase A signaling pathway in osteoblasts. Bone 32(5), 483-88, 2003